

VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR TRENNUNG UND REINIGUNG VON MOLEKUELEN(A1) VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR TRENNUNG UND REINIGUNG VON MOLEKUELEN

Patent number: DE3717211

Also published as:

Publication date: 1988-12-01

 WO8809201 (A1)

Inventor: COLPAN METIN DR (DE); PIOTROWIAK RALF DR (DE)

Applicant: DIAGEN INST MOLEKULARBIO (DE)

Classification:

- **international:** B01J20/28; B01D15/08; C07K3/18; C07H1/06;
C12N15/00; C07H21/00; B01J20/06; B01J20/08;
B01J20/10; B01J20/26; B01J20/24; C07H21/00;
C12P19/34

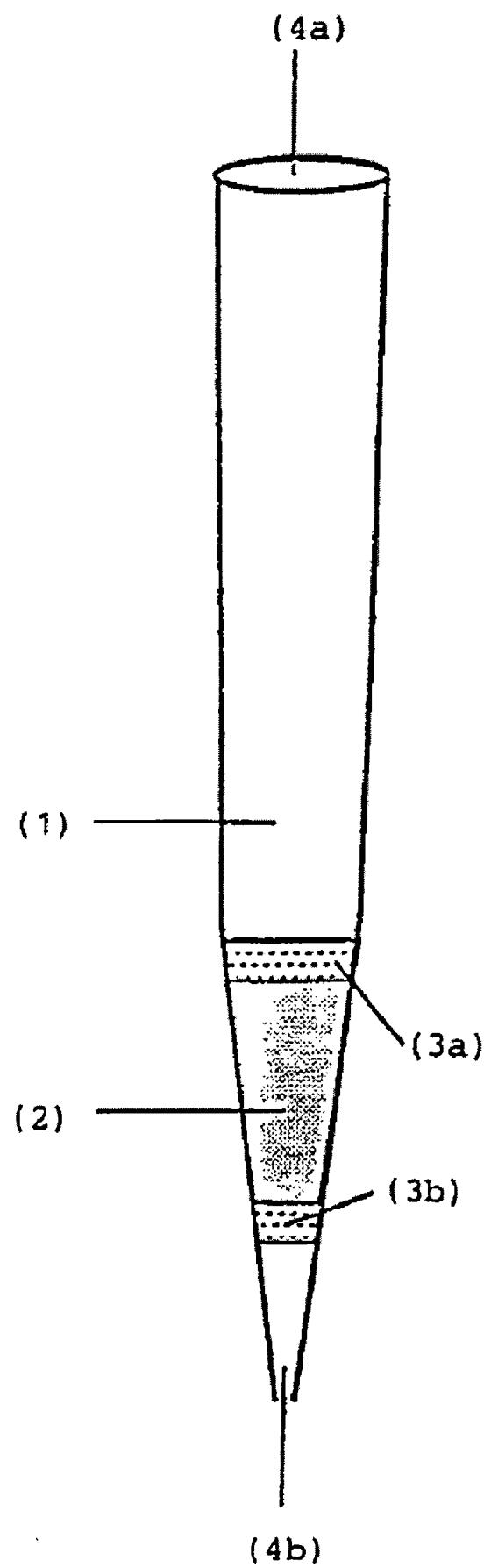
- **european:** B01D15/00; G01N30/48; G01N30/60; G01N33/558

Application number: DE19873717211 19870522

Priority number(s): DE19873717211 19870522

Abstract of DE3717211

In a device for separating and cleaning molecules by adsorption of the molecules on a matrix (2), the solution is forced through the device. The matrix (2) is arranged, between two devices (3a, 3b) permeable to the solution, in a hollow frustum-shaped body (1) open at both ends (4a, 4b), the wider opening (4a) being connected, if necessary, to a cylindrical hollow body. The matrix (2) and the devices (3a, 3b) together occupy 5 to 50% of the volume of the hollow body and the wider opening (4a) of the hollow frustum-shaped body (1) can be connected to a pipette. The use of the device in a process for separating and cleaning molecules on a matrix is also described.



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift
(11) DE 37 17 211 A1

(21) Aktenzeichen: P 37 17 211.5
(22) Anmeldetag: 22. 5. 87
(23) Offenlegungstag: 1. 12. 88

(61) Int. Cl. 4:
B 01 J 20/28

B 01 D 15/08
C 07 K 3/18
C 07 H 1/08
C 12 N 15/00
C 07 H 21/00
// B01J 20/08, 20/08,
20/10, 20/28, 20/24,
C07H 21/00,
C12P 19/34

Behördenzeichen

(71) Anmelder:

Diagen Institut für molekularbiologische Diagnostik
GmbH, 4000 Düsseldorf, DE

(72) Erfinder:

Colpan, Metin, Dr., 4006 Erkrath, DE; Piotrowiak,
Ralf, Dr., 4010 Hilden, DE

(74) Vertreter:

Schönwald, K., Dr.-Ing.; von Kreisler, A.,
Dipl.-Chem.; Fues, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Keller,
J., Dipl.-Chem.; Selting, G., Dipl.-Ing.; Werner, H.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 5000 Köln

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) Vorrichtung und Verfahren zur Trennung und Reinigung von Molekülen

Zur Trennung und Reinigung von Molekülen durch Adsorption der Moleküle an eine Matrix (2) wird die Lösung durch eine Vorrichtung gedrückt, die dadurch gekennzeichnet ist, daß die Matrix (2) in einem an beiden Enden (4a, 4b) offenen, kegelstumpfförmigen Hohlkörper (1), an den gegebenenfalls an der weiteren Öffnung (4a) ein zylindrischer Hohlkörper anschließt, zwischen zwei für die Lösung durchlässigen Einrichtungen (3a, 3b) angeordnet ist, wobei die Matrix (2) und die Einrichtungen (3a, 3b) zusammen 5 bis 50% des Hohlkörpervolumens ausfüllen und die weitere Öffnung (4a) des kegelstumpfförmigen Hohlkörpers (1) an eine Pipette anschließbar ist.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung in einem Verfahren zur Trennung und Reinigung von Molekülen an einer Matrix wird ebenfalls beschrieben.

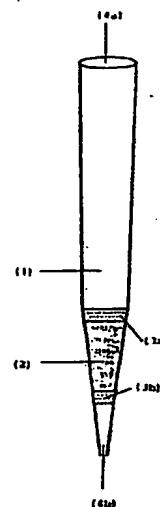


Fig. 2

DE 37 17 211 A1

OS 37 17 211

1

2

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Trennung und Reinigung von Molekülen aus einer Lösung durch Adsorption der Moleküle an einer Matrix, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix (2) in einem an beiden Enden (4a, 4b) offenen, kegelstumpfförmigen Hohlkörper (1), an den gegebenenfalls an der weiteren Öffnung (4a) ein zylindrischer Hohlkörper anschließt, zwischen zwei für die Lösung durchlässigen Einrichtungen (3a, 3b) angeordnet ist, wobei die Matrix (2) und die Einrichtungen (3a, 3b) zusammen 5 bis 50% des Hohlkörpervolumens ausfüllen und die weitere Öffnung (4a) des kegelstumpfförmigen Hohlkörpers (1) an eine Pipette anschließbar ist.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Hohlkörper (1) eine Pipettenspitze ist.
3. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Einrichtungen (3a, 3b) die Matrix (2) im Hohlkörper (1) fixieren.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der engeren Öffnung (4b) und der unteren Einrichtung (3b) ein freier Raum ist.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix aus porösem Chromatographiematerial auf der Basis von Silicagel, Aluminiumoxid, Titandioxid, Hydroxylapatit, Dextran, Agarose, Acrylamid, Polystyrol, Polyvinylalkohol oder anderen organischen Polymeren, Derivaten oder aus Copolymeren der oben genannten Trägermaterialien besteht.
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix ein oberflächlich modifiziertes Chromatographiematerial aus Silicagel, Aluminiumdioxid, Titandioxid, Hydroxylapatit, Dextran, Agarose, Acrylamid, Polystyrol, Polyvinylalkohol oder anderen organischen Polymeren, Derivaten oder aus Copolymeren der oben genannten Trägermaterialien ist.
7. Vorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das oberflächlich modifizierte Chromatographiematerial ein Ionenaustauscher, ein Reversed-Phase- und/oder ein Affinitätschromatographiematerial ist.
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Porengröße der porösen Chromatographiematerialien 20 bis 1000 nm und die Korngröße der Materialien 10 bis 2000 µm, vorzugsweise 75 bis 125 µm beträgt.
9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die die Matrix fixierenden Einrichtungen (3a, 3b) poröse Fritten sind mit Porengrößen von 10 µm bis 1 mm, vorzugsweise 70 bis 200 µm.
10. Verfahren zur Trennung und Reinigung von Molekülen aus einer Lösung durch Adsorption der Moleküle an eine Matrix mittels einer Vorrichtung, in der die zu trennenden Moleküle enthaltende Lösung durch eine in einem Hohlkörper angeordnete Matrix hindurchgedrückt wird, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix (2) von einer oberen und einer unteren Einrichtung (3a, 3b) fixiert wird und daß die Lösung durch die Matrix (2) hindurch in einen oberhalb der oberen Einrichtung (3a) vorhandenen freien Raum gesogen wird und anschließend durch die Matrix (2) hindurch aus dem Hohlkörper

- (1) gedrückt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß Biopolymere getrennt und gereinigt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß Nukleinsäuren und/oder Proteine getrennt und gereinigt werden.
13. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Trennung und Reinigung von Molekülen, vorzugsweise Biopolymeren.
14. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 13 zur Trennung und Reinigung von Proteinen und/oder Nukleinsäuren.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Trennung und Reinigung von Molekülen aus einer Lösung durch Adsorption der Moleküle an eine in der Vorrichtung angeordneten Matrix.

Zur Probenaufbereitung in chemisch, biochemisch und molekularbiologisch orientierten Laboratorien werden Chromatographiematerialien unterschiedlichster Art seit langem in bewährter Weise verwendet. Häufig fallen dabei die Proben in Mikromafstab an, insbesondere im biochemischen und molekularbiologischen, aber auch im analytisch-chemischen Laboratorium. Die chromatographischen Materialien werden auch zur Extraktion von bestimmten Bestandteilen aus den Proben eingesetzt. Die als Festphasenextraktion zu bezeichnende Verfahrensweise kann man sich auch zur Reinigung und Trennung von Substanzgemischen in Lösung zunutze machen. Bislang wurden neben den Chromatographiesäulen, insbesondere in der Hochdruckflüssigkeitschromatographie, auch Kartuschen, Einwegspritzen oder kleine Plastikchromatographiesäulen, die jeweils mit dem gewünschten Chromatographiematerial gefüllt sind, verwendet.

Diese Hilfsmittel, die im Niederdruckbereich Verwendung finden, zeichnen sich unvorteilhaft dadurch aus, daß sie nicht mit etablierten Laboratoriumsgerätschaften kompatibel sind. Ein weiterer Nachteil dieser Hilfsmittel besteht darin, daß sie nur eine Flussrichtung der die zu trennenden und reinigenden Moleküle enthaltenden Lösung zulassen. Man muß also bei der Verfahrensweise gemäß dem Stand der Technik die Probe zunächst in ein Vorratsgefäß, beispielsweise eine Einwegspritze, bringen, um sie dann durch das Flüssmittel, insbesondere Kartuschen oder Extraktionssäulen, zu drücken.

Daher bedient man sich in der Praxis dieser Hilfsmittel überwiegend dann, wenn man die unerwünschten Produkte, adsorbieren will. Ansonsten muß man das Vorratsgefäß, beispielsweise die Einwegspritze, entfernen, mit einem die adsorbierte Substanz eluierenden Lösung erneut beschicken und anschließend durch das Hilfsmittel drücken, um die gewünschten Produkte zu erhalten. Durch das Abnehmen und Aufsetzen eines Vorratsgefäßes besteht jedoch eine Kontaminationsgefahr für den Mitarbeiter, die Umwelt und die Probe selbst. Die Gefahr besteht gerade im medizinisch-technischen Bereich, wenn insbesondere mit infektiösem Material gearbeitet wird, oder auch in biochemisch-molekularbiologischen Laboratorien, wenn insbesondere mit radioaktiven Substanzen hantiert wird.

In der Praxis besteht ein erheblicher Bedarf an einer Vorrichtung, die es in einfacher Weise ermöglicht, ein Verfahren zur Reinigung und Trennung von Molekülen

aus einer Lösung durchzuführen.

Aufgabe der Erfindung ist es also, eine Vorrichtung bereitzustellen, die es ermöglicht,

- Moleküle aus einer Lösung zu extrahieren,
- keine bevorzugte Extraktions- oder Elutionsrichtung zu verlangen,
- eine Abtrennung und Wiederhinzufügung eines Vorratsgefäßes zu vermeiden,
- die Trennungs- und Reinigungsoperationen in einem geschlossenen System durchzuführen,
- die Kontaminationsgefahr für Personal, Umwelt und Probe zu vermeiden, und
- gleichzeitig die Arbeitsweise insgesamt zu erleichtern.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine Vorrichtung, die dadurch gekennzeichnet ist, daß die Matrix 2 in einem an beiden Enden 4a, 4b offenen, kegelstumpfförmigen Hohlkörper 1, an den gegebenenfalls an der weiteren Öffnung 4a ein zylindrischer Hohlkörper anschließt, zwischen zwei für die Lösung durchlässigen Einrichtungen 3a, 3b angeordnet ist, wobei die Matrix 2 und die Einrichtungen 3a, 3b zusammen 5 bis 50% des Hohlkörpervolumens ausfüllen und die weitere Öffnung 4a des kegelstumpfförmigen Hohlkörpers 1 an eine Pipette anschließbar ist.

Die Fig. 1 und 2 zeigen schematisch den Aufbau einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung. Die Matrix 2 wird von zwei Einrichtungen 3a, 3b begrenzt, die gleichzeitig dafür sorgen, daß die Matrix 2 in der gewählten Position fixiert ist. Die Einrichtungen 3a, 3b werden vorzugsweise an der Wandung des Hohlkörpers 1 festgeklemmt. Es kann jedoch neben der Befestigung durch Spannung auch eine Befestigung durch Festkleben der Einrichtungen erreicht werden. Beide Methoden führen zu einem Abdichtungseffekt zwischen den Einrichtungen 3a, 3b und der Wand des Hohlkörpers 1. Vorzugsweise findet sich zwischen der unteren Einrichtung 3b und der engeren Öffnung 4b ein freier Raum, wobei dieser freie Raum klein sein soll gegenüber dem Gesamtvolumen des Hohlkörpers. Die weitere Öffnung 4a der beiden Öffnungen 4a und 4b ist so ausgestaltet, daß sie auf eine handelsübliche Pipette passen. Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung besteht darin, daß der Hohlkörper 1 in Form einer kommerziell im Fachhandel erhältlichen Pipettenspitze (Firma Brand, Gilson, Eppendorf) ausgestaltet ist. Die Matrix 2 der erfindungsgemäßen Vorrichtung besteht vorzugsweise aus einem porösen Chromatographiematerial; insbesondere auf der Basis von Silicagel, Aluminiumoxid, Titandioxid, Hydroxylapatit, Dextran, Agarose, Acrylamid, Polystyrol, Polyvinylalkohol oder anderen organischen Polymeren, Derivaten oder aus Copolymeren der oben genannten Trägermaterialien. Das die Matrix 2 bildende Material kann auch ein oberflächlich modifiziertes, poröses Chromatographiematerial auf der Basis von Silicagel, Aluminiumoxid, Titandioxid, Hydroxylapatit, Dextran, Agarose, Acrylamid, Polystyrol, Polyvinylalkohol oder anderen organischen Polymeren, Derivaten oder aus Copolymeren der oben genannten Trägermaterialien sein.

Die Wahl des entsprechenden Chromatographiematerials ist abhängig von den jeweiligen zu trennenden und reinigenden Molekülen und ist dem Fachmann aufgrund der Regeln in der Chromatographie bekannt. So wird beispielsweise ein polares Molekül, wenn es an der

Matrix 2 adsorbiert werden soll, nur dann an der Oberfläche der Matrix 2 adsorbiert, wenn entsprechende Wechselwirkungen vorliegen, die beispielsweise ebenfalls durch polare Gruppen an der Oberfläche der Matrix 2, jedoch mit entgegengesetzter Polarität, vermittelt werden. So können beispielsweise Ionenaustauschermaterialien als Matrix 2 der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Trennung und Reinigung von polaren Molekülen eingesetzt werden. Weitere bevorzugte Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Vorrichtung können als Matrix 2 ein Reversed-Phase- und/oder oder ein Affinitätschromatographiematerial beinhalten. Die Porengröße der porösen Chromatographiematerialien beträgt vorzugsweise 20 bis 1000 nm, und die Korngröße der Materialien insbesondere 10 bis 2000 µm, vorzugsweise 75 µm bis 125 µm.

Die die Matrix 2 fixierenden Einrichtungen 3a, 3b sind vorzugsweise poröse Fritten mit Porengrößen von 10 µm bis 1 mm, vorzugsweise 70 µm bis 2000 µm.

Die porösen Fritten können aus Kunststoffen, insbesondere aus Teflon (PTFE), Polyethylen, Polypropylen, Polystyrol, Polyurethan etc. bestehen. Aber auch anorganische Werkstoffe, wie Glas und/oder gesintertes Metall sind geeignete Materialien zur Herstellung der porösen Fritten.

Der Vorteil der erfindungsgemäßen Vorrichtung liegt in der praktischen Handhabung und der Art der Packung der Matrix 2, die einen Fluß der die Moleküle enthaltenden Lösung in Hin- und Rückrichtung zuläßt.

Ist der kegelstumpfförmige Hohlkörper 1 beispielsweise als Pipettenspitze ausgebildet, so wird die Pipettenspitze in die Probe eingetaucht, die Probe in der Pipettenspitze durch die Matrix 2 hindurch hochgesaugt und anschließend herausgedrückt. Dadurch wird eine höhere Effizienz der Adsorption erzielt, da die Probe das Chromatographiematerial zweimal passiert. Da man mit einem geschlossenen System arbeiten kann, wird eine Kontaminierung der Probe oder eine Gefährdung der Umwelt vermieden. Die erfindungsgemäße Vorrichtung erleichtert die Arbeitsweise insgesamt, die bei der Trennung und Reinigung von Molekülen anzuwenden ist. Insbesondere können mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vorrichtung auch Biopolymere, insbesondere Nukleinsäuren und Proteine, schnell, einfach und sicher fraktioniert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in einer besonderen Ausführungsform durchgeführt mit einem als Pipettenspitze ausgestalteten Hohlkörper 1. Die die Moleküle enthaltenden, zu trennenden und reinigenden Moleküle können dann mittels einer Pipette durch die Matrix 2 befördert werden. Soll die Pipettenspitze als Säulenersatz in herkömmlichen Verfahren eingesetzt werden, so kann mittels eines Silikonschlauches die Pipettenspitze auch mit einer Einwegspritze verbunden werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist geeignet, insbesondere Biopolymere wie Nukleinsäuren und Proteine zu trennen und zu reinigen, indem als Matrix 2 Ionenaustauscherchromatographiematerialien, wie sie in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949.3 vorgeschlagen werden, verwendet werden. Es handelt sich dabei um mit Anionenaustauschergruppen oberflächlich modifiziertes Chromatographiematerial auf Silicagelbasis. Befindet sich beispielsweise die Matrix 2 in einer Pipettenspitze, so saugt man die Nukleinsäure mit der Pipette durch die Matrix 2. Dabei werden unter Verwendung von Puffern niedriger Ionenstärke die langkettigen Nukleinsäuren adsorbiert. Will man die kurzkettigen Nu-

OS 37 17 211

5

6

kleinsäuren anschließend verwerten, drückt man die Lösung wieder durch die Matrix 2 hindurch und fängt sie auf. Dann können weitere Verfahrensschritte folgen. Ist man jedoch an der Analyse der langkettigen Nukleinsäuren interessiert, kann man nach einigen Waschschriften die langkettigen Nukleinsäuren durch Elution mit Puffern hoher Salzkonzentration (hohe Ionenstärke) wieder eluieren und entsprechend weiterverarbeiten.

Die Fig. 3 zeigt ein Elutionsprofil, das bei Verwendung von Anionenaustauschermaterialien bei der Verwendung der erfundungsgemäßen Vorrichtung erhalten werden kann. Es zeigt sich, daß bei Verwendung des in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949.3 vorgeschlagenen Materials zur Trennung von Nukleinsäuren ein Elutionsprofil erhalten wird, durch das mit steigender Ionenstärke Nukleinsäuren mit steigender Kettenlänge eluierbar werden. So wird doppelsträngige DNS mit Basenpaaren > 500 erst bei einer Ionenstärke von 1,3 M Natriumchlorid erhalten, während einzelsträngige DNS des Phagen M 13 schon bei 1,1 M Natriumchlorid eluiert wird. Die Elutionspeaks sind so scharf, daß sogar "baseline"-Trennungen möglich sind.

Bei einer mittleren Ionenstärke zwischen 0,5 und 1 M Natriumchlorid eluieren Nukleinsäuren wie tRNS, 5S RNS und mRNS. Bei niedrigen Ionenstärken von 0,1 bis 0,5 werden bereits Polysaccharide, Proteine, Metaboliten, Farbstoffe, einzelne Nukleotide, Proteine wie BSA (bovine serum albumin) und kleinere Nukleotide wie beispielsweise ein Nukleotid Decamer, das als "linker" verwendet wird, eluiert.

Eine Verfahrensvariante besteht darin, als Matrix 2 ein Affinitätsadsorbens, wie es beispielsweise in der deutschen Patentanmeldung P 36 27 063 vorgeschlagen wird, zu verwenden. Die Durchführung des Verfahrens erfolgt analog zur oben beschriebenen Verfahrensweise.

Das erfundungsgemäße Verfahren gewährleistet die folgenden Vorteile, insbesondere bei molekularbiologischen Operationen:

- Durchführung von DNS-Präparationen in sogenannten "minikreps".
- Reinigung von mRNS, rRNS, viraler RNS und RNS-Transkripten.
- Reinigung von Proben, die nach Nicktranslation, Endmarkierung oder Oligonukleotid-induzierter Markierung (Oligolabeling) erhalten werden.
- Entfernung der DNS-linker in Klonierungsexperimenten.
- Reinigung von Nukleinsäuren nach Gelextraktion sowie
- schnelle Reinigung von Nukleinsäuren nach Abdauung mit Restriktionsenzymen, Phosphatasebehandlungen, Polymerasereaktionen usw. anstelle einer zeitaufwendigen Phenolbehandlung.

Die bei Verwendung der erfundungsgemäßen Vorrichtung erhältliche Reinheit in Routinepräparationen ist zumindest mit durch Caesiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation erhaltenen Proben vergleichbar. Die isolierten Nukleinsäuren sind befreit von Proteinen, Polysacchariden und anderen Zellmetaboliten und zeigen keinerlei Inhibition von Enzymen bei enzymatischen Reaktionen. Die erfundungsgemäße Vorrichtung kann zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus Oligonukleotiden bis hin zu Plasmiden verwendet werden, wobei der Zeitaufwand auf Bruchteile im Vergleich zu anderen Verfahren eingeschränkt wird.

Die erfundungsgemäße Vorrichtung ist geeignet zur Verwendung in einem Trennungs- und Reinigungsverfahren für Moleküle, vorzugsweise Biopolymere wie Proteine und/ oder Nukleinsäuren, insbesondere von anderen Zellbestandteilen.

Die Verwendung der erfundungsgemäßen Vorrichtung in verschiedenen Verfahren wird in den folgenden Beispielen näher erläutert. Dabei wird die erfundungsgemäße Vorrichtung in einer bevorzugten Ausführungsform, der Pipettenspitze, eingesetzt.

Beispiel 1

In eine 1 ml Pipettenspitze passend für Gilson Pipetman, wird eine 70 µm Polyethylen-Fritte mit 4 mm Durchmesser, Dicke: 1,6 mm, eingeführt und durch Drücken festgeklemmt. Danach werden ca. 70 mg des Chromatographiematerials, vorgeschlagen in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949, trocken eingefüllt. Das Chromatographiematerial wird mit einer wie oben beschriebenen Fritte mit 5,7 mm Durchmesser verschlossen und die Fritte durch Festdrücken an ihrem Platz fixiert.

Analog verfährt man bei 200 µl fassenden Pipettenspitzen bzw. 5000 µl fassenden Pipettenspitzen.

Beispiel 2

Die allgemeine Handhabung der in Beispiel 1 hergestellten Pipettenspitze geschieht wie folgt:

Zunächst wird die Pipettenspitze einmal mit 100 µl eines geeigneten Adsorptionspuffers aquilibriert. Bei einem zu verarbeitenden Probenvolumen von 100 bis 200 µl reicht es aus, die Probe etwa fünfmal durch das Chromatographiematerial zu drücken. Soll jedoch eine größere Flüssigkeitsmenge verarbeitet werden, wie sie beispielsweise nach Gelextraktion anfällt, kann die Probe mittels eines Silikonschlauches, der die Pipettenspitze und eine Einwegspritze verbindet, durch die Matrix hindurchgezogen werden. Es ist dann ausreichend, daß die Probe nur zweimal das Chromatographiematerial passiert.

Dabei sollte die Fließgeschwindigkeit der Lösung nicht höher als 1 ml pro Minute sein.

Als Aquilibrierungs- und Adsorptionspuffer kann der Puffer A verwendet werden.

Puffer A:

400 mM Natriumchlorid
15% Ethanol
50 mM MOPS (3-N-Morpholinopropansulfonsäure)
1 mM EDTA (Ethyldiamintetraacetat)
pH 7,0

Analog zum oben beschriebenen Adsorptionsvorgang werden die Waschschritte durchgeführt. Als Waschpuffer dienen bei Nukleinsäurepräparationen typischerweise die Puffer B, C und D.

Puffer B:

750 mM Natriumchlorid
15% Ethanol
50 mM MOPS
1 mM EDTA
pH 7,0

Puffer C:

1000 mM Natriumchlorid

OS 37 17 211

7

8

15% Ethanol
50 mM MOPS
1 mM EDTA
pH 7,0

Puffer D:
1000 mM Natriumchlorid
50 mM MOPS
pH 7,0

Man füllt ein Eppendorf-Gefäß mit 1 ml Waschpuffer und spült dreimal 150 µl durch das Chromatographiematerial, um Verunreinigungen zu entfernen. Dieser Schritt wird wiederholt.

Die Elution der adsorbierten Nukleinsäuren erfolgt wie in beiden vorangegangenen Schritten entweder mit einer Eppendorf- oder Gilson-Pipette oder mit einer Einwegspritze, wobei darauf zu achten ist, daß die Pipettenspitze mittels eines Silikonschlauches mit der Einwegspritze verbunden ist. Es wird einfach der Elutionspuffer E oder F

Puffer E:
1100 mM Natriumchlorid
15% Ethanol
4 M Urea
50 mM MOPS
1 mM EDTA
pH 7,0

Puffer F:
1500 mM Natriumchlorid
15% Ethanol
50 mM MOPS
1 mM EDTA
pH 7,50

durch die Pipettenspitze gesaugt bzw. gedrückt. Dieser Schritt wird einmal wiederholt. Die Eluate werden vereinigt und die Nukleinsäure daraus gefällt.

Beispiel 3

Eine Pipettenspitze, hergestellt nach Beispiel 1, wird mit 50 mM Natriumphosphatpuffer hydratisiert und äquilibriert, indem man 750 µl Puffer mehrmals durch die Pipette saugt. Eine Probe, die 20 µg Plasmid pBR322 DNA in 500 µl 0,5 M Natriumchlorid und 50 mM Natriumphosphat, pH 7, enthält, wird an das Chromatographiematerial durch fünfmaliges Hochsaugen und Ausdrücken adsorbiert. Nicht gebundene Bestandteile und Verunreinigungen werden durch fünfmaliges Hochsaugen und Ausdrücken von jeweils 1 ml frischem 0,5 M Natriumchlorid und 50 mM Natriumphosphat, pH 7, ausgewaschen. Die Plasmid-DNS wird anschließend mit 1,5 M Natriumchlorid und 50 mM Natriumphosphat, pH 7, eluiert, indem man 1 ml des Elutionspuffers dreimal hochsaugt und ausdrückt.

Beispiel 4

Eine Plasmid-DNS-Probe wird in einer sogenannten Minipräparation typischerweise durch folgende Schritte gewonnen:

Die Bakterienzellen werden über Nacht inkubiert und am nächsten Tag durch Zentrifugation geerntet. Das Pellet wird in 85 µl einer eiskalten Lösung von 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, mit 2 mg/ml Lysozym (frisch zubereitet)

5 tet) aufgeschlossen und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach werden 20 µl einer 0,5 M EDTA-Lösung hinzugefügt und weitere 10 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl 2%igem Triton X' 100 inkubiert man auf Eis für eine weitere Stunde. Die Probe wird in einer Laborzentrifuge 30 Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugiert, und 100 µl des von Zelltrümmern befreiten Zell-Lysates werden in ein anderes Eppendorf-Gefäß überführt, wonach 1 Volumen 2 M Natriumchlorid, 100 mM 10 MOPS, pH 7, und 5 µl Isoamylalkohol zugegeben werden. Eine erfundungsgemäße Pipettenspitze der Firma Gilson, Brand, Eppendorf, hergestellt nach Beispiel 1, wird mit 100 µl Puffer C äquilibriert. Danach adsorbiert man 100 µl einer E. coli-Plasmid-DNS-Probe an dem 15 Chromatographiematerial, indem man die Probe fünfmal auf- und abpipettiert. Nach der Adsorption wird mit insgesamt 2 bis 5 ml des Puffers C gewaschen, woraufhin die Plasmid-DNS mittels 300 µl des Puffers F eluiert wird. Anschließend fällt man die DNS mit 300 µl Isopropanol, läßt 15 Minuten stehen und zentrifugiert dann die 20 Probe dann in einer Eppendorf-Laborzentrifuge 30 Minuten lang.

Beispiel 5

25 Die Isolierung von mRNS, rRNS und viraler RNS von Rohextrakten geschieht wie folgt: Der RNS-Extrakt wird mit Ethanol gefällt und das erhaltene Pellet in TE-Puffer (10 mM Tris/1 mM EDTA, pH 7,5) resuspendiert. Man stellt die Adsorptionsbedingungen durch Zugabe von 0,1 Volumenteil (bezogen auf die resuspendierte Lösung) 5 M Natriumchlorid und 0,2 Volumenteile 250 mM MOPS, pH 7,0 ein. Die Pipettenspitze wird mit 1 µl Puffer A äquilibriert. Danach wird 30 die Probe durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren an das Chromatographiematerial adsorbiert. Man spült mit Puffer A, um Verunreinigungen zu eliminieren. Die Elution erfolgt mit 300 µl des Puffers C. Die RNS wird durch Zugabe von 2,5 Volumenteilen Ethanol gefällt. 35 Nach Stehenlassen bei -20°C, 30 Minuten, wird in einer Eppendorf-Zentrifuge insgesamt 30 Minuten bei höchster Drehzahl zentrifugiert. Das Pellet wird vor der Weiterverarbeitung sorgfältig mit Ethanol gewaschen. Die Probe soll einen Nukleinsäuregehalt von höchstens 40 15 µg haben.

Beispiel 6

45 Reinigung von mRNS zur Synthese der entsprechenden cDNA wird wie in Beispiel 5 beschrieben durchgeführt.

Beispiel 7

55 Nicht verbrauchte Triphosphate in Markierungsreaktionen wie Nicktransformation, Endmarkierungen und Oligonukleotid-abhängigen Markierungen (Oligolabeling) von DNS werden wie folgt entfernt:

Die Markierungsreaktion der DNS wird durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA pro 20 µl Probenvolumen beendet, und man stellt die Adsorptionsbedingungen durch Zugabe von 1 Volumenteil des Puffers C ein. Die Gesamtsalz-Endkonzentration soll in etwa 500 mM betragen. Die Pipettenspitze gemäß der Erfindung wird mit 100 µl Puffer B äquilibriert. Die Probe wird durch fünfmaliges Hochsaugen und Ausdrücken an das Chromatographiematerial adsorbiert und insgesamt mit 10 ml des Puffers B gewaschen, um die nicht reagierten

OS 37 17 211.

9

Nukleotide abzutrennen. Die Fließgeschwindigkeit des Waschpuffers soll vorzugsweise ca. 5 ml pro Minute betragen. Die markierte DNS wird anschließend mit insgesamt 300 µl des Puffers F eluiert. Die Probe kann direkt weiterverwendet werden, wenn sie mit dem zur Hybridisierung vorgesehenen Puffer mindestens 1 : 20 verdünnt wird. Andernfalls wird die Probe ausgefällt und in TE-Puffer gelöst.

10

lung der DNS-Probe geschieht wie in Beispiel 8 beschrieben.

5

Beispiel 8

10

Die Entfernung eines DNS-linkers von einer DNS mit mehr als ca. 400 Basenpaaren in einem Klonierungsexperiment wird wie folgt durchgeführt:

Die zu reinigende Probe wird mit 1 Volumeneinheit des Puffers C verdünnt, damit die Endkonzentration an Salz ungefähr 500 mM beträgt. Die erfindungsgemäße Pipettenspitze wird mit 100 µl des Puffers A äquilibriert. Die Probe wird wie in den vorhergehenden Beispielen adsorbiert. Die erfindungsgemäße Pipettenspitze wird mit Puffer B gespült, um die Verunreinigungen zu entfernen. Die DNS wird desorbiert und eluiert mit insgesamt 300 µl des Puffers F. Anschließend isoliert man die DNS durch Isopropanolfällung (Zugabe von 1 Volumeneinheit) und lässt 15 Minuten auf Eis stehen, wonach sich eine Zentrifugation der Probe in einer Eppendorf-Zentrifuge für die Dauer von 30 Minuten anschließt. Danach wäscht man sorgfältig mit 70%igem Ethanol.

Beispiel 9

30

Die Schnellreinigung einer DNS-Probe nach enzymatischer Modifizierung (zum Beispiel durch Phosphatase, Restriktionsendonuklease, Polymerasen usw. sowie Cofaktoren) erreicht man gemäß folgender Verfahrensweise:

Das zugrunde liegende Reaktionsvolumen beträgt 50 µl und enthält nicht mehr als 100 mM Natriumchlorid. 5 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0, werden zum Reaktionsvolumen hinzugefügt, um die Modifizierungsreaktion abzubrechen. Ein Volumeneinheit des Puffers C wird zugegeben, um die Adsorptionsbedingungen einzustellen mit einer Salzkonzentration von etwa 500 mM. Die erfindungsgemäße Pipettenspitze wird äquilibriert, die Probe wird adsorbiert und anschließend eluiert wie in Beispiel 8 beschrieben. Auch die weitere Behandlung der Probe geschieht wie in Beispiel 8 beschrieben.

Beispiel 10

50

Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann auch dazu benutzt werden, um Agarose- und Acrylamid-Verunreinigungen effizient abzutrennen. Dies ist insbesondere dann erforderlich, wenn Geleleutionen der Probe stattgefunden haben. Bei Anwendung der im folgenden beschriebenen Verfahrensweise wird die DNS gleichzeitig konzentriert, selbst wenn das Startvolumen einige µl beträgt. Die DNS hat eine Größe von > 400 Basenpaaren und kann in einer Menge von 5 ng bis 15 µg vorliegen. Die Probenvorbereitung und die Äquilibrierung der erfindungsgemäßen Pipettenspitze wird wie in Beispiel 8 beschrieben durchgeführt. Dann überführt man die Probe in eine Einwegspritze und drückt sie zweimal durch die erfindungsgemäße Pipettenspitze. Dabei soll die Fließgeschwindigkeit bei etwa 250 µl/min liegen. Die erfindungsgemäße Pipettenspitze wird anschließend mit 5 µl des Puffers B gewaschen bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 5 ml/min. Die Weiterbehand-

- Leerseite -

Fig. : 19 : 11
KG

Nummer:
Int. Cl. 4:
Anmeldetag:
Offenlegungstag:

37 17 211
B 01 J 20/28
22. Mai 1987
1. Dezember 1988

3717211

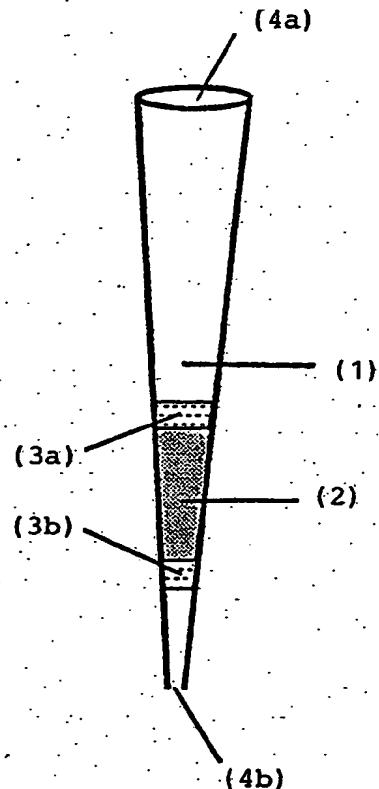


Fig. 1

808 848/367

ORIGINAL INSPECTED

Fig. 20/1

20

3717211

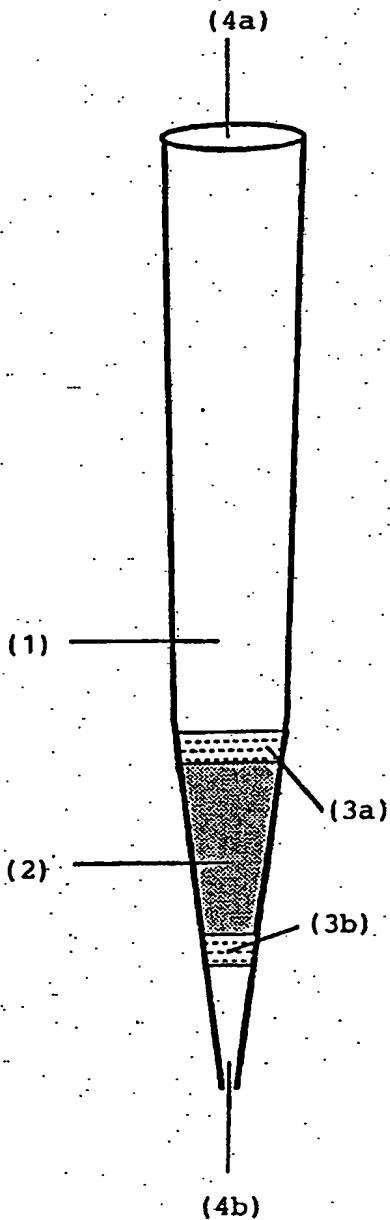


Fig. 2

21

3717211

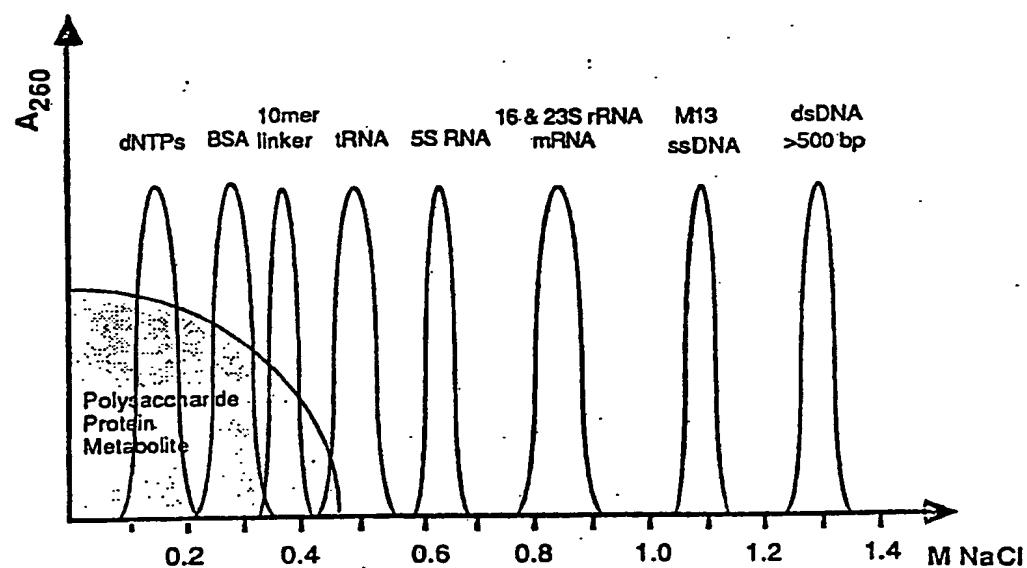


Fig. 3